МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра здравоохранения –
Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь
_____И.В. Гаевский
«_23_» _____декабря_____2013 г.

Регистрационный № 007-1013

МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЛЮША (*BORDETELLA PERTUSSIS*), ПАРАКОКЛЮША (*BORDETELLA PARAPERTUSSIS*) В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:
Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:
к.м.н. Колодкина В.Л., Мартынов В.С.

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, использование которого повысит эффективность лабораторной диагностики коклюшной и паракоклюшной инфекций в Республике Беларусь.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-лабораторной диагностики, врачей-инфекционистов, иных врачей – специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь.

1 Показания

Необходимость выявления и дифференциации возбудителей коклюша и паракоклюша у кашляющих пациентов.

2 Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники

- Автоматические дозаторы переменного объема (от 0,1 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до1000 мкл);
- Вортекс;
- Компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме реального времени, хранения данных и анализа;
- Ламинарный бокс с бактерицидной лампой;
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об/мин;
- Морозильник;
- Набор реагентов для выделения ДНК из клинических образцов;
- Набор олигонуклеотидов (праймеров и проб);
- Одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200, 1000 мкл;
- Одноразовые пластиковые микропробирки на 0,2, 0,5, 1,5 мл;

- Одноразовая пластиковая посуда для постановки ПЦР в режиме реального времени – микропробирки, стрипы, 96-луночные плашки (посуда должна подходить к прибору, на котором ставится РТ-ПЦР);
- Реактивы для проведения ПЦР – фермент *Taq* ДНК-полимераза (5 ед/мкл); 10×буфер для *Taq* полимеразы без $MgCl_2$; 10 мМ смесь дНТФ; 25 мМ раствор $MgCl_2$; ДМСО 25%;
- Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 мл и 0,5 мл;
- Термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени;
- Холодильник;
- Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.

3 Подготовка клинических образцов для исследования

3.1 Клинический материал

- мазки со слизистой задней стенки ротоглотки,
- секционный материал (трахеи и легких),
- культуры микроорганизмов.

К мазку, взятому сухим ватным тампоном и помещенному в стерильную пластиковую пробирку (1,5-2 мл), добавляют 300 мкл стерильной бидистиллированной воды и тщательно перемешивают на вортексе. Тампон аккуратно удаляют из пробирки стерильным пинцетом, отжав его о стенки пробирки. Полученный смыв с тампона используют для выделения ДНК.

Хранение мазков: мазки анализируются немедленно после поступления, или приготовленный смыв с тампона хранится при -20°С.

Секционный материал гомогенизируют в лизирующем буфере, прилагаемом к набору для выделения ДНК, и полученную суспензию используют для выделения ДНК.

Культуры микроорганизмов: колонию микроорганизмов ресуспендируют в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 7,0. Полученную суспензию используют для выделения ДНК.

3.2 Выделение ДНК

Экстракцию ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша из образцов клинического материала осуществляют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°С.

4 Мультиплексная TaqMan ПЦР в режиме реального времени

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность и концентрация праймеров и проб для РТ-ПЦР

Вобудитель/ мишень	Праймер/ проба	Последовательность нуклеотидов (5'- 3')	Длина ПЦР продукта (п.н.)	Оптимальная концентрация (nM)
B. pertussis IS481	прямой обратный проба	ATCAAGCACCGCTTTACCC TGAGCGTAAGCCCACTCAC **FAM**-ACCGCCCACAGACCAATGGC-**BHQ1**	95	450 450 450
B. pertussis (тиолазный ген)	прямой обратный проба	AAACCCGATGACTCGTATGC ATCTGGGAGATCGCATGAAC **FAM**-TGCCGTATGGGTCAGATTGGGA-**BHQ1**	118	300 300 300
B. parapertussis IS1001	прямой обратный проба	ACAGGCGGAGATCGTCTATG ATCCTGGCGTAGTTGATTGG **Cy-5**-ACGAGAGGTCATTGATCGGGTGC-**BHQ2**	103	150 150 150
ген человека GAPDH (glyceralde-hyde-3-phosphate dehydro-genase)	прямой обратный проба	GGCTCCCTTGGGTATATGGT TTGATTTTGGAGGGATCTCG **TAMRA-**ACCTTGTGTCCCTCAATATGGTCCT **-BHQ2**	120	200 200 200

Все олигонуклеотиды синтезируют под заказ в высушенном виде. Каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в бидистилированной воде. Для удобства готовят растворы праймеров и проб с конечной концентрацией равной 75 мкМ. Разведения готовят по формуле: V [H_2O] = n [праймера /пробы] / C [раствора].

Пример: если количество (n) высушенного праймера/пробы в пробирке равно 27,5 нмоль, то для приготовления раствора с концентрацией [C] равной 75 мкМ необходимо добавить H_2O в объеме (V) 366 мкл.

Полученные растворы могут храниться длительное время при -20ºС. Однако следует избегать многократного размораживания и замораживания растворов.

Для удобства из растворов праймеров/проб с концентрацией 75 мкМ готовят две рабочие двадцатипятикратные (25х) смеси.

Смесь №1 включает набор праймеров и пробы к мишени IS481 и набор праймеров и пробы к мишени IS1001.

Смесь №2 включает набор праймеров и пробы к тиолазному гену и набор праймеров и пробы к гену GAPDH человека.

Концентрация праймеров и проб в смеси № 1 и № 2 в 25 раз выше конечной концентрации праймеров и проб в реакционной смеси для ПЦР.

Объем каждого праймера и пробы для приготовления 25х смеси рассчитывается по формуле:

$V = C_к * V_к / C_и$, где

V – необходимый объем праймера/пробы

$C_к$ - конечная концентрация праймера/пробы

$V_к$ - конечный объем смеси

$C_и$ - исходная концентрация праймера

Таблица 2 – Приготовление 25х смеси №1

Объем смеси №1 (мкл)	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к IS 481 (мкл)	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к IS 1001 (мкл)	Объем H_2O (мкл)
100	15 х3	5 х3	40
200	31,3 х3	10 х3	131,6
300	45 х3	15 х3	120
400	60 х3	20 х3	160
500	75 х3	25 х3	200

Таблица 3 – Приготовление 25х смеси №2

Объем смеси №2 (мкл)	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к гену тиолазы (мкл)	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к гену человека (мкл)	Объем H_2O (мкл)
100	10 х3	6,7 х3	49,9
200	20 х3	13,3 х3	135,6
300	30 х3	22,5 х3	142,5
400	40 х3	26,7 х3	199,9
500	50 х3	33,3 х3	250,1

Общий пул приготовленной 25 кратной смеси праймеров и проб разливают в пробирки по 20 или 50 мкл и хранят при -20ºС, избегая многократного размораживания и замораживания растворов. Смесь размораживается непосредственно перед постановкой ПЦР. Для постановки РТ-ПЦР готовят параллельно две реакционные смеси, которые отличаются только смесью праймеров и проб. В первую смесь добавляют 25х смесь праймеров и проб № 1, во вторую – 25х смесь праймеров и проб № 2.

Таблица 4 – Реакционная смесь для ПЦР №1 и №2

Реагенты	Концен-трация	Объем на одну реакцию (мкл)	Объем на N реакций (мкл)	Конечная концентрация в реакционной смеси
ПЦР буфер	10х	2,5	2,5·(N+1)	1х
$MgCl_2$	50 мМ	2	2·(N+1)	4 мМ
дНТФ	10 мМ	0,5	0,5·(N+1)	0,2 мМ
смесь праймеров и проб № 1 или №2	25х	1	1·(N+1)	1х
ДМСО	25%	2,5	2,5·(N+1)	2,5%
Taq-полимераза	5 ед/мкл	0,4	0,4·(N+1)	2 ед/реакцию
H_2O деионизирова-ная		11,1	11,1·(N+1)	
Вся смесь		20	20·(N+1)	

Приготовленные реакционные смеси разливают в лунки планшета или пробирки для РТ-ПЦР по 20 мкл так, чтобы на каждый образец и контроли приходилось по две лунки со смесью №1 и по две лунки со смесью №2. По 5 мкл ДНК-образца добавляют в соответствующие лунки со смесью №1 и параллельно в лунки со смесью №2. Положительный контроль в объеме 5 мкл добавляют в лунки в последнюю очередь. В качестве положительного контроля используют смесь ДНК *B. pertussis, B. parapertussis* (по 100 копий геномной ДНК на реакцию) и ДНК человека (50 пг на реакцию). В качестве отрицательного контроля используют 5 мкл H_2O.

Приготовление реакционных смесей, раскапывание их в лунки планшета или пробирки и добавление ДНК-образцов проводится на льду. Перед постановкой в амплификатор следует осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с) или встряхиванием планшета.

4.1 Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени

Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме реального времени) для выполнения соответствующей прграммы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (таблица 5).

Таблица 5 – Программа амплификации ДНК

Температура,°С	Время	Кол-во циклов
95	5 мин	1
95	10 с	40
60	1 мин детекция флуоресцентного сигнала	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM/Green и Cy5/Red для проб с реакционной смесью №1 и для флуорофоров FAM/Green и TAMRA/Orange для проб с реакционной смесью №2.

Установить планшет или пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

5 Результаты

5.1 Определение

C_T – значение: номер цикла в котором сигнал флюоресценции пересекает пороговую линию (threshold).

Threshold – пороговый уровень флюоресценции.

Примечание – величина Threshold устанавливается вручную на уровне 10 % (FAM, TAMRA, Cy5), от максимального уровня флуоресценции положительного контрольного образца (ПКО) в последнем цикле амплификации. При этом кривая флуоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

5.2 Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_T.

Таблица 6 – Гены-мишени и их каналы детекции

№ реакции/ реакционной смеси	№1		№2	
Канал детекции	FAM/Green	Cy5/Red	FAM/Green	TAMRA/Orange
Ген-мишень	IS 481	IS 1001	ген тиолазы	ген GAPDH человека

Принцип анализа результатов амплификации следующий:
анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам.

Результат амплификации по каналу считается **положительным** если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла C_T для данного канала менее граничного значения, ***отрицательным*** – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения C_T) или если определено значение порогового цикла C_T, превышающее указанное граничное значение.

Образец считается положительным на ДНК *B. pertussis*, если сигнал продуцируется в двух каналах: FAM/Green на IS481 и FAM/Green на ген тиолазы и значение C_T ниже 40 для обеих мишеней, или сигнал продуцируется дважды только в канале FAM/Green на IS481 при повторном исследовании новой аликвоты.

Образец считается положительным на ДНК *B. parapertussis* если сигнал продуцируется в канале Cy5/Red на IS1001 и значение C_T ниже 40.

Образец считается отрицательным, если сигнал флюоресценции отсутствует в каналах FAM/Green на мишень IS481, FAM/Green на тиолазный ген и Cy5/Red на IS1001 или значение C_T сигнала флюоресценции равно или выше 40, но при этом сигнал присутствует в канале TAMRA/Orange на ген GAPDH человека и значение C_T ниже 40.

5.3 Достоверность результатов ПЦР

Результаты реакции считаются достоверными, если в положительном контроле сигнал флюоресценции присутствует по всем четырем каналам, а в негативном контроле сигнал флюоресценции отсутствует по всем четырем каналам.

Если в лунках с клиническим образцом отсутствует сигнал флюоресценции по всем четырем каналам, включая канал TAMRA/Orange на ген GAPDH человека, то результат по данному клиническому образцу считается недостоверным.

Если сигнал флюоресценции в лунках с клиническим образцом присутствует в канале FAM/Green на ген тиолазы и отсутствует в канале FAM/Green на IS481, то результат по данному клиническому образцу считается недостоверным в независимости от результатов по другим каналам.

6 Возможные проблемы при постановке ПЦР в режиме реального времени и их устранение

Проблемы	Возможные причины	Способы решения
1) В пробе положительного контроля значение порогового цикла C_T по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение	- ДНК в положительном контроле разрушилась - разрушились пробы, меченные флуоресцентным красителем, или праймеры	- повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов с использованием нового положительного контроля и (или) новых наборов праймеров и проб; соблюдать правила их транспортировки и хранения
2) Кривая флуоресценции в клинических образцах пересекает пороговое значение, но не имеет типичной S-образной формы	- наличие примесей в клинических образцах	- более тщательная очистка при выделении ДНК из клинических образцов
3) В пробе отрицательного контроля по любому из каналов FAM, Cy5, FAM, TAMRA зафиксировано значение порогового цикла C_T	- загрязнение отрицательного контроля	- повторить исследование для всех положительных образцов с использованием нового отрицательного контроля; предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации